

## **Részletes kutatási jelentés**

A 4 éves projekt a következő célkitűzésekkel indult:

- 1, Szintetikus, neurotoxikus A $\beta$ -peptid aggregátumok előállítása és sokoldalú fizikokémiai jellemzése.
- 2, Az A $\beta$  oligomerekkel, protofibrillumokkal és fibrillumokkal kölcsönhatásba lépő neuronális fehérjék azonosítása
- 3, A Zn<sup>2+</sup>-ionok szerepének vizsgálata (hogyan befolyásolják az A $\beta$  aggregációt és toxicitást), az ösztadiol és a Zn<sup>2+</sup> kölcsönhatások vizsgálata.
- 4, Új neuroprotektív peptidomimetikumok tervezése, szintézise és vizsgálata.
- 5, Az A $\beta$ -peptidek hatásmechanizmusának és az Alzheimer-kór patomechanizmusának vizsgálata.

A kutatási célkitűzések megvalósítását az alábbiakban részletezzük:

### **1/ A szintetikus A $\beta$ -aggregátumok jellemzése**

Az Alzheimer-kór (AK) betegségmodelljeink vizsgálatában elengedhetetlen, hogy minden kísérletben az adott aggregációs fokú (oligomer, protofibrillum vagy fibrillum)  $\beta$ -amiloid (A $\beta$ ) peptidet alkalmazzuk. Ez csak egyetlen módon érhető el: ha a monomer A $\beta$  1-42-ből kiindulva kontrollált, standardizált körülmények között vezetjük az aggregációs folyamatot. Saito (2006) publikációja alapján ez a standardizálás a kutatócsoportunknak sikerült először a világon: a hőmérséklet, a puffer összetétele és pH-ja és a reakcióidő változásával szinte tetszőleges aggregációs fokú A $\beta$  1-42 állítható elő helyben (in situ), a biológiai kísérletet közvetlen megelőzően. (Bozsó Zs. et al: Peptides **31**, 248-256, 2010.)

Az A $\beta$  peptidek aggregációs fokát 3 módszerrel határoztuk meg:

- 1/ DLS (dinamikus fényszóródás)
- 2/ AFM (atomerő mikroszkópia; az oligomerek mérete meghatározható)
- 3/ TEM (transzmissziós elektron mikroszkópia: a fibrillumok mérhetők)

Az A $\beta$  peptidek konformációjára CD spektroszkópia mérésekből következtettünk. A preparálási módszerek paramétereinek helyes megválasztása és standardizálása lehetővé tette, hogy a szintetikus prekursor-peptidekből mindig a kívánt szerkezetű és aggregációs fokú A $\beta$  1-42 polimer keletkezzen.

Következtetéseink:

1/ A preparálásra használt pufferoldat kémiai összetétele döntően befolyásolja a keletkező A $\beta$ -aggregátum polimerizációs fokát és konformációját. Bizonyos pufferekben (pl. NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>) csak A $\beta$  1-42 oligomerek keletkeznek, más pufferek (pl. foszfátpuffer) a protofibrillum és fibrillum képződésének kedveznek.

2/ Alacsony pH-értékek (pH 5,5 vagy kevesebb) a protofibrillum és fibrillum képződésének kedveznek.

Az idegsejt bizonyos organelumaiban uralkodó alacsony, de fiziológiás pH-értékeken (pH 5,5 v. kevesebb) gyorsan ( $\leq$  24 óra) aggregál az A $\beta$  1-42 protofibrillumokká, sőt 3 nap alatt fibrillumokká. Ezek az aggregációs formák tehát az idegsejten belül fiziológiás körülmények között is kialakulhatnak. Mivel vizsgálataink bebizonyították, hogy az A $\beta$  1-42 fibrillumok különösen jól kötődnek bizonyos mitokondriális (membrán) ill. a citoplazmában és a mikrotubuláris rendszerben előforduló fehérjékhez, elsődleges fontosságúnak tartjuk az intracelluláris A $\beta$  1-42 hatásainak kutatását.

3/ Az A $\beta$  1-42 konformációs változásainak CD-vizsgálata és az ezt követő toxicitási mérések azt mutatják, hogy a  $\beta$ -amiloid toxicitás kialakulásában nem csupán az aggregáció foka számít, hanem a peptidlánc konformációja is. Kísérleteink szerint a toxikus konformáció kialakulása viszonylag lassú, az A $\beta$  1-42 koncentrációjától függően 1-3 napot vesz igénybe.

Hipotézisünk szerint a toxikus konformáció a Tompa P. által részletesen jellemzett belsőleg rendezetlen („intrinsically disordered”) fehérjeszerkezetnek felel meg, emiatt az A $\beta$  1-42 számos fehérjével

léphet nem-specifikus kölcsönhatásba.

## **2/Neuroprotektív hatású rövid peptidek és peptidomimetikumok**

Az A $\beta$ 42 szálmmodelljére molekuladinamikai módszerekkel dokkoltunk egy nagy sorozat polipeptidet és mimetikumot, ezek közül első lépésben a legjobbakat (16 vegyület) szintetizáltunk és MTT tesztben in vitro screeneltük őket.

Első lépésben két vegyületcsalád bizonyult neuroprotektív hatásúnak a számítógépes tervezés után szintetizált vegyületekből:

- 1/ Az LPYFD pentapeptid analógjai, amelyeket P29, P59, P79, P85 és BAM-9 kóddal rövidítünk. Ezek olyan peptidmimetikumok, amelyek megkötődnek a fibrillumok (és valószínűleg az A $\beta$  oligomerek) felszínén, bevonják azt és megakadályozzák az A $\beta$  1-42 valamennyi kölcsönhatását.
- 2/ Az RIIGL pentapeptid analógjai, amelyek közül a retro-inverzo peptid bizonyult a legjobbnak. Ezek szintén az A $\beta$  1-42 felszínhez kötődve fejtik ki neuroprotektív hatásukat.

A további vizsgálatok során az RIIGL analógok in vivo nem mutattak megfelelő neuroprotektíót, ugyanakkor új vezérvegyületeket is találtunk. A projekt folyamán összesen négy peptid és peptidomimetikum családot terveztünk és vizsgáltunk:

- 1, Az LPYFD pentapeptid és analógjai in vitro kiemelkedően jó neuroprotektív hatásúak az A $\beta$  1-42-vel szemben, viszont in vivo kísérletekben csak rövid ideig (2-3 óra) hatásosak, mert a szervezetből gyorsan kiürülnek. Emiatt hosszabb biológiai felezési idejű vegyületeket terveztünk, szintetizáltunk és vizsgáltunk, ezek közül a P85, minden szempontból alkalmas további gyógyszerfejlesztésre.
- 2, Mind in vitro, mind in vivo kísérletekben kiváló neuroprotektív hatásúak a 2 vagy 3 prolint tartalmazó tetra- és pentapeptidek, ill. peptidmimetikumok. Ezek hatásmechanizmusát most vizsgáljuk, előzetes kísérletek az A $\beta$  konformációt megváltoztató hatást valószínűsítik.
- 3, Egy újonnan bevezetett tetrapeptid (KEGV) és analógjai szintén csak in

vitro voltak neuroprotektív hatásúak.

4, Az A $\beta$  1-42 eredeti FRHDS szekvenciája alapján tervezett tri- és tetrapeptidek, valamint ezek mimetikumai in vitro kísérletekben kiváló neuroprotektív hatásúak az A $\beta$  1-42-vel szemben. Valószínűleg az A $\beta$ -integrin kölcsönhatást szabályozzák.

Az 1. peptid- és mimetikum családból összesen 90 neuroprotektív vegyületet szintetizáltunk és vizsgáltunk meg, közülük a P85 peptidmimetikumot választottuk ki gyógyszerfejlesztési célra. A vegyületeket szabadalmilag is védjük, a szabadalmat összeállítottuk („Amyloid structure modifying peptidomimetics as neuroprotective drug candidates for treatment of Alzheimer’s disease”) és rövidesen benyújtjuk.

A 2. vegyületcsaládból 65 neuroprotektív vegyületet védünk szabadalmilag („Small peptide inhibitors of amyloid toxicity for the treatment of disorders associated with abnormal protein folding into amyloid or amyloid-like aggregates”), ez a benyújtás is folyamatban van.

### **3/ Peptidek, peptidomimetikumok és fehérjék molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálata**

Fizikai-kémiai módszerekkel vizsgáltuk meg a  $\beta$ -amiloid peptid (A $\beta$  1-28) és az irodalomból ismert Leu-Pro-Phe-Phe-Glu (LPFFD) pentapeptid kölcsönhatását (Majzik A. et al.: Colloids and Surfaces B. **81**, 235, 2010.):

1/Felületi plazmon rezonancia (SPR) – a második plazmon rezonancia maximum megjelenése az A $\beta$  1-28 és LPFFD összekapcsolódását jelzi.

2/Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS)– SiO<sub>2</sub> és TiO<sub>2</sub> nanorészecskéken – csak gyenge A $\beta$  –LPFFD kötés mutatható ki.

3/Izoterm titrációs mikrokalorimetria (entalpiaváltozás mérés) – az LPFFD gyengén kötődik az A $\beta$  1-28-hoz.

Új tömegspektrometriás vizsgálati módszert dolgoztunk ki a fibrilláris A $\beta$  és a kedvező in vivo tulajdonságokkal rendelkező pentapeptidjeink kölcsönhatásának (felszínén való kötődés) vizsgálatára. A vizsgált 5 peptidnél (az LPYFD ill. az RIIGL analógjai) hasonló kötéseket kaptunk, mint a korábbi NMR méréseknél.

A kölcsönhatások, a peptidek és mimetikumok lipofilicitásának és foszfolipofilicitásának meghatározására egy új HPLC kromatográfiás eljárást használtunk: az „immobilizált mesterséges membrán” (IAM) kromatográfiát, speciális adszorbensen. A 2. pontban felsorolt 4 vegyületcsaládból egyedül a prolingazdag peptidek és mimetikumok (2. család) mutattak erős kölcsönhatást a sejtmembránt modellező kromatográfiás adszorbenssel, ezek hatását tovább vizsgáljuk.

#### **4/ A különböző A $\beta$ aggregátumok in vitro és in vivo hatása**

Három A $\beta$ -aggregátum típust vizsgáltunk: kis (24 órás) és nagy (168 órás) A $\beta$ -oligomereket és A $\beta$ -fibrillumokat.

In vitro MTT-teszten (viability teszt, SH-SY5Y sejtek) az oligomerek alig toxikusak, a fibrillumok igen.

In vivo elektrofiziológiai vizsgálatok szerint (egysejt-elvezetés) mind az oligomerek, mind a fibrillumok hatásosak a neuronokon, de az NMDA receptorokon eltérő hatást mutatnak (ld. 7. pont, Juhász G. et al.: Brain Res. **1233**, 307-310, 2008.).

Sikerült olyan A $\beta$  1-42 oligomereket előállítanunk, amelyek az in vitro MTT-tesztben (SH-SY5Y differenciált neuroblasztóma sejtvonal) is toxikus hatásúak. Mivel a neuroblasztóma sejtvonal nem teljesen adja vissza az agyban a sokféle sejttypus közötti kapcsolatokat és kölcsönhatásokat, a szövetszelet-technika alkalmazása mellett döntöttünk. Egy új ex-vivo (egér hippocampus szelet szervfürdőben, MTT-teszt) teszt módszert állítottunk be, hogy screenelni tudjuk az újonnan előállított szintetikus vegyületek neuroprotektív hatását az A $\beta$ -oligomerek által okozott sejtkárosodásra (Mózes E. et al: Brain Res. Bull. 2012, 521-525).

Ugyancsak elektrofiziológiai kísérletekkel, egér hippocampus szeletekben bizonyítottuk, hogy a különböző A $\beta$  1-42 aggregátumok (oligomer, ill. fibrillum) gátolják a tanulási folyamatokat (LTP gátlás).

Új módszert dolgoztunk ki a különböző A $\beta$ -aggregátumok toxicitásának meghatározására: mivel az A $\beta$  1-42 már kis koncentrációban károsítja az endotél sejteket, a toxikus hatás mind primer endotél sejtmembrán, mind a mesterséges vér-agy –gát modellen jól mérhető. (Kooperáció az MTA-SZBK-val, Deli Mária csoportjával; Deli M. et al: J. Alz.Dis. **22**, 777-794, 2010).

Sikerült beállítani egy új elektrofiziológiai módszert az A $\beta$  1-42 toxikus hatásának mérésére: in vivo megmérjük patkányagyban az icv bejuttatott A $\beta$  1-42 hatását az LTP-re. Ezzel a módszerrel az új neuroprotektív vegyületeink hatása is mérhető, iv. ill. ip. beadás után (Juhász G. et al.: J. Alz. Dis. **16**, 189-96, 2009.).

## **5/ A különböző A $\beta$ aggregátumokkal kölcsönhatásba lépő fehérjék**

Az élő szervezet, szövet, sejt működésének molekuláris szinten történő vizsgálatára egyik legkorszerűbb módszer a proteomika, amely az egyes fehérjék azonosításán túl képes azok mennyiségi változásainak, ill. poszt-transzlációs módosulások minőségi és mennyiségi nyomonkövetésére. A fehérje-expresszió változásának nyomonkövetésére legszélesebb körben használt módszer a 2D-poliakrilamid elektroforézis. Bármilyen kísérletet csak akkor van értelme végezni, ha azt megfelelő reprodukálhatósággal meg tudjuk ismételni. Különösen igaz ez a kísérleti állatokon végzett biológiai kutatásokra, mert az egyedek közötti variabilitás jelentősen befolyásolhatja az ismételhetőséget. Technikai szempontból a 2D-poliakrilamid gélelektroforézis egy összetett módszer, mellyel több mint ezer fehérje mennyiségi változásait tudjuk nyomonkövetni. Ennek következtében sok kérdéses volt az eljárás ismételhetősége. Egyik vizsgálatunknak az volt a célja, hogy meghatározzuk, milyen laboratóriumi körülményeink között milyen biológiai és technikai variabilitásra számíthatunk egérben, vagy patkányban végzett neuroproteomikai kísérleteinkben. A jelen OTKA-pályázat keretében megvásárolt FUJIFILM FLA-5100 lézer szkennel alkalmazásával megállapítottuk (Journal of Proteomics 74, 894-901,

2011), hogy laboratóriumunkban a nagyméretű gélen végzett 2D-PAGE technikai varianciája 9,3%, az egy fészekaljából származó egerek agyi proteomjának meghatározásának varianciája 9,3-13,1%, míg az ugyanabból az egértörzsből véletlenszerűen válogatott állatoknál ez az érték 10,8-11,4% között változott. Ezekből a kísérletekből levonható az a következtetés, hogy a 2D-PAGE-sel végzett proteomikai vizsgálatok reprodukciójában a technikai variancia dominál a biológiai variancia felett. Ebből következik, hogy a proteomikai kísérletekhez is használható az eddig követett gyakorlat, mely szerint egy-egy kísérleti csoportba ugyanabból az állattörzsből random módon is összeválogathatók az állatok.

Azt tapasztaltuk, hogy a 2D-PAGE vizsgálatainknál csaknem minden detektált foltban több fehérje volt kimutatható. Ez érthető is, mert egy-egy sejt-, szövet-mintában több ezer, több tízezer fehérje is van, míg festési módszertől függően egy-egy gélen csak 1000-3000 folt detektálható. Annak megállapítására, hogy egy-egy foltban detektált több fehérjének milyenek a mennyiségi arányai, „jelzés-mentes” tömegspektrometriás módszert dolgoztunk. (Kimutatták, hogy egy fehérje oldatfázisú tripszines hidrolízissel kapott három legintenzívebb peptidjének intenzitása arányos a fehérje mennyiségével. Ezt az eredményt terjesztettük ki gélben történt emésztésre is.) Segítségével a két mintában lévő, azonos foltban jelentkező fehérjék expressziója, ill. annak változása pontosabban meghatározható. Módszerünkkel jól meg tudjuk becsülni az egy foltban levő különböző fehérjék abszolút mennyiségeit is ki (Journal of Proteomics, közlésre beküldve).

Korábbi proteomikai vizsgálatainkban megállapítottuk (Journal of Neurochemistry 94, 617-628, 2005), hogy egér agy szinaptoszóma membrán preparátumból számos fehérje specifikusan kötődik fibrilláris  $\beta$ -amiloid-hoz. A 40 fehérjét csoportokba osztottuk: 1. Alzheimer betegséggel, 2. citoskeletális szerveződéssel, 3. idegsejt adhézióval, 4. neuronális membránnal kapcsolatos fehérjék, 5. idegsejt-specifikus fehérjék és mitokondriális fehérjék. Közülük egyiket, a glicerinaldehid-3-

foszfat dehidrogenáz (GAPDH) fehérjét további vizsgálatoknak vetettük alá, mert felmerült a lehetőség, hogy az Alzheimer-kór kialakulásában feltételezett kaszkádfolyamatokban szerepet játszik. Transzmissziós elektronmikroszkópiával kimutattuk, hogy a szintetikus GAPDH erősen kötődik fibrilláris  $\beta$ -amiloid(1-42)-höz. Western-blott vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a kötődés nem ionos kölcsönhatáson alapul, mert növekvő sókoncentráció nem befolyásolta a kötődést. Igazoltuk, hogy a GAPDH az amiloid más formáival is kölcsönhatásba lép, melyben a peptid C-terminális része felelős. Különböző celluláris kompartmentekben levő GAPDH fehérjék is kötődnek a  $\beta$ -amiloid(1-42)-höz. Kísérleteink megerősítették a feltételezést, hogy ez a kölcsönhatás szerepet játszhat az Alzheimer-kór kifejlődésében (Verdier Y. et al.: Journal of Peptide Science 14, 755, 2008).

Tovább vizsgálva a  $\beta$ -amiloid peptid Alzheimer-kór patogenezisében játszott szerepét, kötési tesztet végeztünk fehérje-chipen lévő 8100 humán rekombináns fehérje és a  $\beta$ -amiloid(1-42) peptid között (Virok D. et al.: Journal of Proteome Research 10, 1538, 2011). Kísérleteink során 324 fehérjét találtunk, melyek potenciális kölcsönható partnerei az oligomer  $\beta$ -amiloid-nak. A kölcsönható fehérjék funkcionális osztályozását Gene Ontology (GO) analízissel, az internet-alapú DAVID tudásbázis felhasználásával végeztük, ami a 324 fehérjét 30 funkcionális kategóriába sorolta. Ezek közül a legérintettebb GO biológiai funkció kategória a fehérje-bioszintézis: a transzláció, amelybe 24 fehérje és a transzlációs elongáció, amelybe 13 fehérje tartozott. Ezen fehérjék jelentős része mitokondriális és nem-mitokondriális riboszóma-komponens, ill. transzlációt inicializáló faktor. Ezeken túl, sok fehérje tartozik az RNS processzáls, axonális transzport és sejtciklussal kapcsolatos kategóriákba, támogatva az A $\beta$ 1-42 intracelluláris hatásának hipotézisét. A GO alapú funkcionális csoportosításon túl elvégeztük a STRING analízist is, amely különböző adatbázisok (Pubmed, MINT, KEGG, BIND, BioGRID) szűrésével elkészítette a kölcsönható fehérjék hálózatát.



ELISA kísérletben igazoltuk, hogy  $\beta$ -amiloid (1-42) koncentrációfüggően kötődik patkány hippocampusból tisztított riboszóma komplexekhez, valamint, hogy az  $\beta$ -amiloid(1-42) gátolta a riboszómális fehérjeszintézist (nyúl retikulocita transzlációs reakcióban csökkent a fluoreszcens luciferáz enzim bioszintézise).

Az Alzheimer-kór patogenezisében az egyik érintett sejt-kompartment a mitokondrium, ahol az  $A\beta$  toxikus szerepe ismert. A mitokondrium károsításáért az  $A\beta$  mitokondriális fehérjékhez való kötődését teszik felelőssé. Valószínű, hogy az általunk talált 13 mitokondriális és 6 riboszómális fehérjén okozott együttes hatása az, ami a fehérjeszintézist gátolja.

Az egyre szaporodó ismeretek ellenére még ma sem ismert az amiloid peptidek által indukált folyamatok összessége, ráadásul az  $A\beta$ 1-42 különböző formái másképpen hatnak az egyes biokémiai folyamatokra. Az oligomer  $A\beta$ 1-42 toxikus hatást vizsgálva meghatároztuk, hogy egy kontrollált aggregáltsági fokú  $A\beta$ 1-42 peptid milyen globális fehérjeszint-változásokat okoz az Alzheimer-kór kutatásában elfogadott SH-SY5Y humán neuroblasztoma sejt-vonalon. Proteomikai módszerekkel 47 megváltozott expressziójú fehérjét detektáltunk, amelyek közül 22 mennyisége növekedett, 25-é csökkent  $A\beta$ 1-42-vel történt kezelés hatására (Földi I. et al.: J. Neurochem. 117, 691, 2011). A down-regulált fehérjék a fehérje bioszintézisben (transzláció), metabolikus folyamatokban, citoszkéletális organizációban, transzkripció szabályozásában, mRNS processzálasában, fehérjefeldolgozásban (transzport, proteolízis, poszt-transzlációs módosítás), míg az up-regulált fehérjék legnagyobb része a stresszválasszal kapcsolatos, de találtunk fehérje-feldolgozással, metabolikus folyamatokkal és a transzkripcióval összefüggésbe hozható fehérjéket is. Az azonosított fehérjékből látható, hogy az  $A\beta$ 1-42 toxicitása számos intracelluláris életfolyamatot érintett. A stresszfehérjék nagy száma jelzi a sejtek beindult védekezési

mechanizmusát az A $\beta$ 1-42-vel szemben. Többségük az endoplazmás retikulum chaperon fehérjéje.

Az Alzheimer- kór előfordulása a nemek között eltérő és kapcsolatba hozható az ösztrogének mennyiségének idő előrehaladtával történő csökkenésével. Az ösztradiol-alapú hormonpótló terápia néhány klinikai kipróbálásnál csökkentette az Alzheimer-kór kockázatát és a kognitív működési zavarokat, amely felveti az ösztradiol (E2) védő szerepét. Kimutattuk (Szegő É. et al.: Neuroendocrinology 93, 90-105, 2011), hogy az E2 szabályozza a szinaptikus fehérjéket és folyamatokat, megnöveli a citoszkeleton flexibilitását és megváltoztatja az agy szénhidrát-metabolizmusát. Eredményeink arra utalnak, hogy az E2 kicsiny, de lényeges változást indukál különböző fehérjehálózatokban és mintegy kumulatív hatásként az agy működését alapállapotból egy flexibilisebb, gyorsabb reagálóképességű állapotba állítja. Az agyi proteom összetételének nyomonkövetésével fehérjeszintű választ kerestünk az A $\beta$ 1-42 in vivo neurotoxicitására, ill. az ösztrogén előkezelés hatására. Azt találtuk, hogy az A $\beta$ 1-42 a nucleus basalis magnocellularis-substantia innominata agyterület számos biokémiai folyamatot érintett, de káros hatásai E2 előkezelésre csökkentek, nem alakultak ki, ill. ellenkező irányú folyamatok indultak be. Pl. a dihidropirimidináz-2 fehérje expressziója A $\beta$ 1-42 kezelés hatására 44%-kal megemelkedett, míg az E2 előkezelés 27%-kal csökkentette azt. Hasonló jellegű változások történtek az szomatoszenzoros kéregben is (Psychoneuroendocrinol 35, 807-819, 2010).

## **6/ Az ösztrogének és a cinkionok szerepe az A $\beta$ aggregációban**

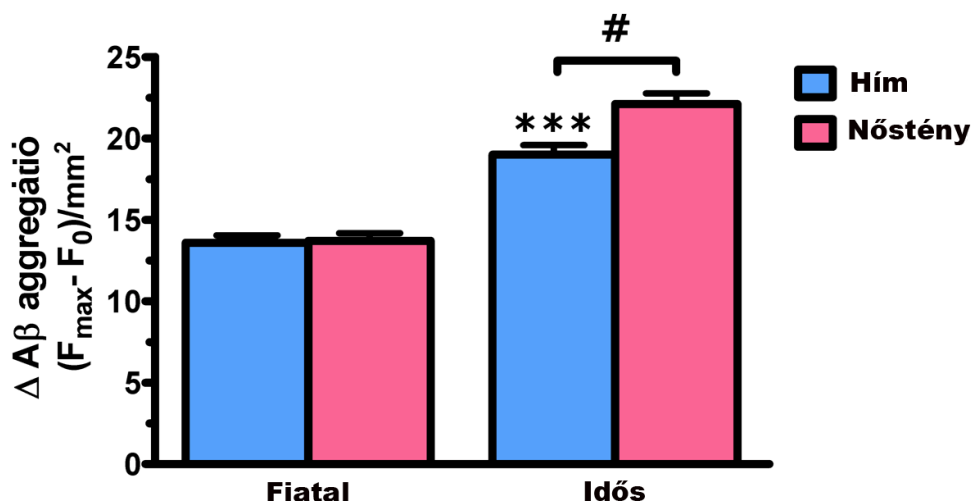
A glutamáterg aktivitás során felszabaduló Zn<sup>2+</sup> bizonyítottan elősegíti az Alzheimer-kórra (AD) jellemző neokortikális  $\beta$ -amiloid (A $\beta$ ) aggregációját. Patkányból származó akut hippocampus szeleteken megvizsgáltuk, hogy az öregedés befolyással van-e a Zn<sup>2+</sup> dinamikájára (felszabadulás-visszavétel), mivel a jelenség magyarázattal szolgálhat arra nézve, hogy az Alzheimer-kór esetében miért rendkívül fontos

kockázati faktor az életkor. A szeleteken a  $K^+$ -mal indukált cink felszabadulás szignifikánsan nagyobb mértékű volt az idősebb (65 hetes a 10 hetes állatokkal összehasonlítva) patkányok esetében, továbbá az idős nőstényeknél kiemelkedően a legnagyobb mértékű cink felszabadulás volt tapasztalható. A jelenséghez társult az idősebb agyszeletek lassabb cinkfelvétele az extracelluláris térből, illetve a fiatal agyszeletek enyhe mitokondriális mérgezése. A  $Zn^{2+}$ -A $\beta$ 1-42 aggregátumok toxikusnak bizonyultak az agyszeleteken, szemben az önmagában alkalmazott A $\beta$ 1-42 kezeléssel. A szövet stimulálása ( $K^+$ -mal indukált depolarizációval), amely az endogén  $Zn^{2+}$  felszabadulásához vezetett, a szintetikus A $\beta$ 1-42 neuronra szelektív aggregációját és toxicitását eredményezte, amelyre az idősebb agyszeletek sokkal érzékenyebbek voltak. Ez a mechanizmus jelzi, hogy az extracelluláris fémek homeosztázisa, különösen az extraneuronális  $Zn^{2+}$  kiürülése, a korfüggő AD A $\beta$  patológiájában fontos szerepet játszik.

Jelenlegi tudásunk alapján ez volt az első olyan eset, hogy a  $Zn^{2+}$  indukálta A $\beta$  aggregációt bisANS fluoreszcens festék, illetve ultracentrifuga alkalmazásával jellemeztük. Kimutattuk, hogy az A $\beta$ 1-42 az endogén cinkkel másodpercek alatt bis-ANS kötő formába aggregálódik, melynek következménye az LTP és a mitokondriális aktivitás gátlása. Korábbi vizsgálatok során, mi és más kutatócsoportok is azt találtuk, hogy sejtkultúrában a  $Zn^{2+}$  megakadályozta az A $\beta$ 1-42 toxikus hatását, habár a toxicitási vizsgálatok hosszabb idő alatt (pl. 48 óra) zajlottak le, ez pedig lehetővé tette, hogy a  $Zn^{2+}$ -A $\beta$  reakció során az A $\beta$  fibrillumokba rendeződjön, amely kevésbé toxikus az oligomer változathoz képest. Ezzel ellentétben, az agyszeletek esetében azt találtuk, hogy a  $Zn^{2+}$  indukálta A $\beta$  aggregátumok már három óra elteltével toxikusak voltak és egy órán belül LTP gátló hatásuk volt. Az oligomer (de nem a fibrillum) aggregáció mértéke arányos a toxicitás mértékével, ebből következik, hogy a  $Zn^{2+}$  az A $\beta$  aggregáció felgyorsításával elősegíti, megnöveli annak toxicitását.

A bisANS festék az A $\beta$ 1-42 toxikus, oldható, oligomer formáját jelöli, amely hasonló az oldható, toxikus úgynevezett A $\beta$  ADDL-oligomerekhez.

A 13,8 S (300 kDa) méretű  $\text{Zn}^{2+}$  segítségével képződött A $\beta$ -bisANS formák, tömegüket és méretüket tekintve rendkívüli hasonlóságot mutatnak a korábban már leírt amyloidból származó diffuzibilis ligandokban (ADDL) kimutatott A $\beta$  oligomerekkel. A hasonlóságot szedimentációs sebességvizsgálattal mutattuk ki. Az ADDL formák mérete 4 és 12 S között mozgott és ezekhez hasonlóan a cink indukálta A $\beta$  oligomerek is neurotoxikusnak bizonyultak, illetve a neuronok felszínéhez kötődtek (1. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy a cink elősegíti az ADDL-hez hasonló erősen diffúzibilis oligomerek képződését és meggyorsítja a képződés folyamatát. Az ADDL formának 24 órás inkubációs időre van szüksége, míg a  $\text{Zn}^{2+}$  indukálta A $\beta$  oligomerek mindössze 3 óra alatt kifejtik toxikus hatásukat.



1. **Ábra: Kor és nem függő A $\beta$  aggregáció bis-ANS fluoreszcenciával vizsgálva.** Az eredmények bis-ANS  $\Delta F_{\max}$  értékei hippokampális szeleteken  $\text{K}^+$  kezelést követően.. A  $\Delta \text{Zn}^{2+}$  és a  $\Delta A\beta$  aggregáció szignifikánsan nagyobb az idős (65 hetes) patkányokban, mint a fiatalokban, és szignifikánsan nagyobb a nőstényekben, mint a hímekben \*\*\*  $p < 0.001$ , #  $p < 0.002$ , ANOVA with post hoc t-tests,  $n = 30$  szelet/eset.

A  $\text{Zn}^{2+}$  indukálta A $\beta$ 1-42 egy különleges formája meglehetősen gyorsan jut be az idegsejtekbe, ugyanis méréseink során már igen alacsony koncentrációban ( $<0.5 \mu\text{M}$ ) detektálható volt a neuronokban. Ez a  $\text{Zn}^{2+}$  által módosított oldható A $\beta$ , amely elég kisméretű ( $<20 \text{ nm}$ ) ahhoz, hogy belépjen a szinaptikus részbe, kísérleteink során különösen neurotoxikus formának bizonyult.

Az LTP gátlás felléphet az NMDA receptor blokkolása vagy a cink által indukált A $\beta$  oligomerek intrinzik toxicitása következtében. Elképzelhető, hogy a szinaptikus részben felhalmozódó A $\beta$ , azáltal hogy csapdázza a  $\text{Zn}^{2+}$  ionokat, - amelyek az LTP-t szolgáló NMDA receptorok működését biztosítják - felborítja a szinapszisok fiziológiáját. A szolubilis A $\beta$  oligomerek 1:1 arányban kötődnek a cinkhez alacsony mikromoláris affinitással, ugyanakkor az A $\beta$  precipitáció által okozott egyensúlyi zavarból kifolyólag, az aggregátumok a cink fiziológiás megfelelőjének akár háromszorosát is megköthetik. Idővel az A $\beta$  oligomerek cinkkel kitöltött fibrillumokká alakulnak, amelyek - korábbi eredményeinknek megfelelően - az oligomer állapotnál kevésbé toxikusak.

Eredményeink bizonyítéku szolgálnak az extracelluláris  $\text{Zn}^{2+}$ -szabályozás megváltozásának hatásmechanizmusára, és magyarázatot adnak az öregedés és a nem mint rizikófaktorok jelenlétére az Alzheimer-kór kialakulásának tekintetében. Feltételezzük, hogy az öregedéssel járó ATP termelés csökkenés miatt, a szövetszelet nem képes hatékonyan visszavenni a cinket annak neurotranszmissziós felszabadulása után.

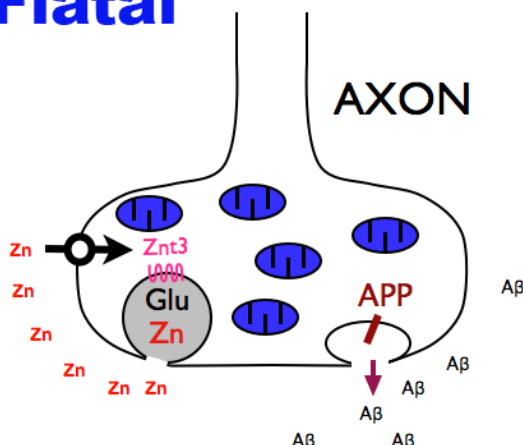
Ez megnövekedett extracelluláris cink-koncentrációhoz vezet, amely elősegíti az A $\beta$  aggregációt. A $\beta$  felszabadulás a szinaptikus aktivitás során is végbemegy, amely lehetővé teszi a peptid és a cink fizikai közelségét az extracelluláris térben. Ez a jelenség különösen fontossá teszi a visszavétel mechanizmusát, amely megelőzi a cink és az A $\beta$  reakcióját. Azt találtuk, hogy az extracelluláris A $\beta$  jelenléte megakadályozza a cink bejutását a sejtbe, amely hozzájárul a sejten belüli cinkháztartás felborulásához az Alzheimer-kór során. Azt is megfigyeltük, hogy a cink által indukált A $\beta$

aggregátumok gátolják a mitokondriális aktivitást, amely tovább rontja az energia-függő cinkfelvételt, így egy ördögi kör alakulhat ki.

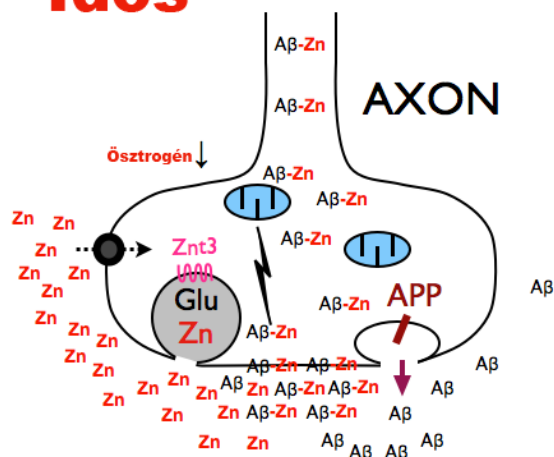
Az agyszelet aktiválását követő cink-felszabadulás mértéke a korral együtt növekedett, ugyanakkor a patkány nőstényekből származó szövetszeletek extracelluláris terében a cink szignifikánsan nagyobb koncentrációkat ért el a hímekből származó szövetszeletekhez képest. Míg ez a növekedés csak  $\approx 20\%$  volt, addig az öregedéssel járó relatív kockázata a nőstényekben mindössze  $\approx 1.56$  összehasonlítva a hímekkel. Ebből következik, hogy az Alzheimer-kór kockázatának kismértékű növekedése a nőstények esetében arányos a kismértékben megnövekedett cink felszabadulással. A nőstény patkányok hippokampális szövete a kor előrehaladtával nagyobb cink-felszabadító képességgel rendelkezik a szinaptikus aktivitás során, amely megfelel annak a tapasztalatnak, hogy az idős nőstény egerek hippocampuszában magasabb koncentrációban található felszabadítható cink. A vezikuláris cink koncentráció szintje a korral együtt megemelkedik a nőstény egerek hippocampuszában, mivel az ösztrogén koncentráció csökkenése a ZnT3 fehérje koncentrációjának megemelkedését eredményezi. A korábbi tapasztalatokkal összhangban, elsőként írtuk le a kor- és nemfüggő cink felszabadulás A $\beta$  aggregációt elősegítő hatását.

Egy olyan Alzheimer-kór modellt hoztunk létre, amely összefoglalja a kor- és nemfüggő változásokat, amelyek közvetlen kapcsolatban állnak azokkal a neurokémiai változásokkal, amelyek a betegség krónikus lefolyásához vezetnek (2. ábra).

**Fiatal**



**Idős**



2. **Ábra: Az Alzheimer-kór cink-amiloid szinaptikus modellje.** A szinaptikus aktivitás alatt a glutamáterg neuronokból cink ionok szabadulnak fel, amelyeket energia-függően a sejtek vissza is vesznek. Az életkor előrehaladtával a mitokondriális károsodások és az energetikai viszonyok miatt ez a visszavétel csökken. A Zn-AB komplex képes behatolni a sejtekbe és gátolni a mitokondriális aktivitást. Káros hatásként a komplex tovább rontja a szabad cink ionok visszavételét a neuronokba. A krónikus cink hiány a neuronok pusztulásához vezet.

## 7/ A különböző Aβ aggregátumok hatása a szinaptikus plaszticitásra

A különböző Aβ aggregátumok (oligomerek, fibrillumok) különböző jelátviteli utakat aktiválnak. A fibrilláris Aβ 1-42 egyik kötőfehérje családja az integrinek. Ezek heterodimer, transzmembrán sejtadhéziós receptorok. Kísérleteink (in vivo, patkány hippocampus) szerint a protofibrilláris – fibrilláris Aβ 1-42 az integrinek aktiválásán keresztül is szabályozza az NMDA és AMPA receptorokat, így hosszabb távon a szinaptikus plaszticitást.

A különböző aggregáltságú Aβ 1-42 peptidek eltérően befolyásolják a szinapszisok működését. A protofibrilláris-fibrilláris Aβ 1-42 az NMDA receptort aktiválja, ezzel szemben az AMPA receptor aktivitást

szignifikánsan csökkenti. Az oligomer A $\beta$  1-42 viszont mindkét receptort aktiválja (megnövekedett neuron tüzelési aktivitás). Ezek az in vivo (egysejtelvezetés, patkány hippocampus) vizsgálatok azt bizonyítják, hogy csak jól jellemzett aggregáltsági fokú A $\beta$  peptidekkel érdemes kísérletezni.

A prekursor peptidből frissen előállított Abeta-oligomerek hatását tanulmányoztuk egér hippocampus szeleteken. Rövid és hosszú távú szinaptikus plaszticitást vizsgáltunk, melyek a tanulási folyamatok háttérében álló jelenségek. A kezelt szeleteken a rövid távú szinaptikus plaszticitás egyik formája, a paired-pulse facilitáció megváltozott a kontroll szeletekhez képest. Szintén károsodást mutatott a hosszú távú szinaptikus potenciáció, melyet 180 percig regisztráltunk. A depotenciáció során az erősödött szinapszisok gyengítését idézzük elő, mely szintén fontos folyamat a memórianyomok kialakításában. Az amiloid-bétával kezelt szeleteknek megváltozott a depotenciációs tulajdonsága. Ezek az eredmények magyarázzák a korai Alzheimer-kórban tapasztalt kognitív hanyatlás háttérében álló folyamatokat.

A hippocampus CA1 régiójában vizsgáltuk a fibrilláris, ill. az oligomer A $\beta$  1-42 hatását a glutamát (NMDA és AMPA) receptorokra, ill az integrinekre. Kísérleteink alapján az integrin  $\beta$ 1 alegységén kötődik az A $\beta$  1-42 és a kötődés egy hosszú jelátviteli folyamatot indít el, amelynek egyik lépése az src-kináz aktivitása. (Juhász G. et al.: J. Alz. Dis. **19**, 1053-67, 2010.) Hipotézisünk szerint ez a lépés vezet az NMDA receptor fehérje, ill. a tau-fehérje foszforilációjához, ill. hiperfoszforilációjához.

## **8/ Tanulási – magatartási és memória vizsgálatok**

Patkány Morris vízlabirintus teszten vizsgáltuk az A $\beta$ -oligomerek ill. fibrillumok hatását a tanulási és memória folyamatokra (10  $\mu$ l-es mikroinjekciós bevétel az entorhinális kéregbe, ill. hippocampusba). A fibrillumok ebben a kísérletben hatástalanok (kicsapódnak a bevétel



helyén), a mozgékony A $\beta$ -oligomerek szignifikánsan rontják a tanulási és memóriarögzítési folyamatokat, 25  $\mu$ M és 200  $\mu$ M közötti dózisban.

Új módszert alkalmaztunk az A $\beta$ -oligomerek bevitelére patkány agyba: az intranazálisan bevitt  $\beta$ -amiloid közvetlenül bejut az agy bulbus olfactorius részébe és lerontja a tanulási-memóriarögzítési folyamatokat (Sipos E. et al.: Cell. Mol. Neurobiol. **30**, 405-413, 2010.)

Kidolgoztuk az Alzheimer-kór új állatmodelljét (patkány, 3 hónapos, átlagosan 12-15 nm átmérőjű A $\beta$ -oligomerek icv bevitele mindkét oldalon, 1 hét rekreáció után Morris vízlabyrinth kísérletek, ill. szövettani vizsgálatok). Párhuzamos kísérletekben APPxPS1 transzgén egereket alkalmazva megállapítottuk, hogy az új patkánymodellünk (standard A $\beta$  oligomerek icv bevitelét alkalmazva) az APPxPS1 transzgén egerekhez igen hasonló tanulási és memória problémákat mutatott, így a jövőben a kutatásban helyettesítheti a drágább transzgén egereket.

Az új állatmodellünket (oligomer A $\beta_{42}$  icv bevitel) összehasonlítottuk a szakirodalomban rendelkezésre álló standard AD patkánymodellel. Két különböző módon juttattuk be az agyba A $\beta$  1-42 oligomereket, ill. protofibrillumokat: a 3. agykamrába (icv) ill. mikroinjekcióval a hippocampus CA1 régió közvetlen közelébe. Az operáció után 2 héttel vizsgáltuk az A $\beta$  1-42 bevitel különbségeinek hatását az állatok térbeli memóriájára, teljesítményére. Az icv bevitelnél mind az oligomer, mind a protofibrilláris A $\beta$  1-42 komoly memória és teljesítményromlást idézett elő, az új állatmodellünk tehát jól működik. A hippocampális A $\beta$  1-42 mikroinjekció is szignifikáns teljesítményromlást idézett elő. A két állatmodell (közvetlen A $\beta_{42}$  bejuttatás patkány agyba mikroinjekcióval, intracerebroventrikulárisan (icv) ill. intrahippocampalisan (ihc)) azonos értékűnek tekinthető, mindkettő alkalmas az A $\beta$  oligomerek toxicitásának ill. az új neuroprotektív anyagok védő hatásának tesztelésére.